母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌对哺乳仔猪血浆生化参数、粪便微生物及其代谢产物的影响

韩　丽[1,2]　解培峰[1]　赵　越[1,2]　高乾坤[2]　章文明[3]　王占彬[2]　印遇龙[1]　孔祥峰[1*]

（1.中国科学院亚热带农业生态研究所，亚热带农业生态过程重点实验室，动物营养生理和代谢过程实验室，长沙 410125；2.河南科技大学动物科技学院，洛阳 471003；3.赢创德固赛（中国）投资有限公司，北京 100600）

摘　要：本试验旨在研究母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌对哺乳仔猪血浆生化参数、粪便微生物及其代谢产物的影响。试验选用 2~4 胎次、预产期相近的妊娠第 85 天的健康大白猪 40 头，随机分为 2 组，每组 20 头猪。对照组饲喂基础饲粮，试验组在基础饲粮中添加 250 g/t 的枯草芽孢杆菌制剂。从母猪妊娠第 85 天开始饲喂至产后第 21 天结束。分别于仔猪 7 和 21 日龄，每组选取 8 窝仔猪，每窝选 1 头体重接近的仔猪，前腔静脉采血，测定血浆生化参数；采集新鲜粪便样品，测定其中微生物数量及短链脂肪酸、生物胺含量。结果表明：与对照组相比，试验组 7 日龄仔猪粪便中乙酸和色胺含量显著增加（$P<0.05$），粪便中大肠杆菌数量显著降低（$P<0.05$），粪便中亚精胺（$P=0.068$）和精胺（$P=0.074$）含量以及乳酸杆菌/大肠杆菌（$P=0.053$）呈增加趋势；试验组 21 日龄仔猪血浆尿素氮和甘油三酯含量以及粪便中亚精胺和精胺含量显著降低（$P<0.05$）。综上所述，母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌可调控哺乳仔猪脂代谢和氮代谢相关血浆生化参数，减少肠道中大肠杆菌数量，增加肠道部分生物胺和乙酸含量，从而改善哺乳仔猪的肠道健康和生长发育。

关键词：妊娠母猪；哺乳仔猪；芽孢杆菌；生化参数；微生物；代谢产物

中图分类号：S828

哺乳仔猪的健康水平及生长状况直接影响养猪场的经济效益[1]。规模化养猪场存在仔猪初生重偏小、应激大和断奶过渡难等问题，易引起仔猪肠道菌群失衡、消化不良、生长阻滞和腹泻等，严重影响仔猪的生长发育[2]。而提高围产期母猪的营养水平和健康状况能促进其子代的生长发育[3]。因此，研发“母-子一体化”营养调控措施对增强仔猪健康、促进其生长发育具有重要意义。近年来研究发现，益生菌可改善肠道菌群平衡、促进营养物质的吸收利用等，对动物肠道健康及其生长发育具有重要作用[4]。目前常用的益生菌主要包括乳酸杆菌、双歧杆菌和芽孢杆菌等。由于芽孢杆菌能形成芽孢，具有耐酸碱、耐高温高压等特点，

收稿日期：2017-10-18

基金项目：国家重点研发计划课题（2017YFD0500503）；赢创德固赛（中国）投资有限公司横向课题

作者简介：韩　丽（1992—），女，河南周口人，硕士研究生，从事动物营养与饲料科学研究。E-mail：1404082917@qq.com

*通信作者：孔祥峰，研究员，博士生导师，E-mail: nnkxf@isa.ac.cn

且便于生产和储存[5]，是目前较为理想的饲料添加剂。笔者前期研究发现，母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌可提高机体蛋白质利用率，增强机体免疫力，增加肠道有益菌数量及生物胺、短链脂肪酸（SCFA）含量，改善母猪肠道健康和营养状况[6]；同时，显著降低了子代腹泻率，另外，仔猪初生窝重、初生个体均重、断奶窝重、断奶窝个体均重和平均日增重（18.05、1.51、63.19、6.24 和 0.23 kg）与对照组（17.07、1.50、61.72、6.15 和 0.22 kg）相比均有所提高[7]。新生仔猪的消化系统和免疫功能还不够完善，易受病原菌侵袭，引起仔猪腹泻等。因此，保证有益菌能在新生仔猪肠道内早期定植具有重要意义。目前，国内外关于枯草芽孢杆菌在仔猪和保育猪上的研究较多，但通过母体添加研究其对后代仔猪影响的报道较少。鉴于此，本研究在围产期母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌制剂，评价其对后代仔猪血浆生化参数、粪便微生物及其代谢产物的影响，为益生菌在“母-子一体化”营养调控中的应用提供依据。

1　材料与方法

1.1　试验设计与饲养管理

动物饲养试验于 2017 年 3—5 月份在中国科学院亚热带农业生态研究所永安动物实验基地开展。试验选用 2~4 胎次、预产期相近的妊娠第 85 天的 40 头健康大白猪，随机分为 2 组，每组 20 头猪。对照组饲喂基础饲粮，试验组在基础饲粮中添加 250 g/t 的枯草芽孢杆菌制剂。从妊娠第 85 天开始饲喂妊娠母猪饲粮，妊娠第 100 天更换为泌乳母猪饲粮，到产后第 21 天结束。试验各组哺乳仔猪第 8 天开始补饲不添加枯草芽孢杆菌制剂的教槽料。各组饲粮营养水平不低于 NRC（2012）猪营养需求标准，基础饲粮组成及营养水平同文献[7]。试验用枯草芽孢杆菌制剂均由赢创德固赛（中国）投资有限公司提供（活菌数量≥4×10^9 CFU/g），其添加剂量根据前人相关研究报道[1,4,8]及生产厂家建议确定。预产期前 7 天将试验猪转入彻底消毒的产仔舍，其他饲养管理均按商业养猪场规范进行操作。

1.2　样品采集

分别于仔猪 7 和 21 日龄，每组随机选取 8 窝仔猪，每窝选取 1 头体重接近的仔猪，前腔静脉采血，肝素抗凝，离心分离血浆，-20 ℃冻存，用于血浆生化参数测定；采集新鲜粪便样品，-80 ℃冻存，用于肠道微生物数量及其代谢产物含量测定。

1.3　仔猪血浆生化参数测定

根据试剂盒（罗氏公司）说明，用全自动生化分析仪（罗氏 cobas® c 311）测定血浆中总蛋白（TP）、白蛋白（ALB）、尿素氮（UN）、甘油三酯（TG）和总胆固醇（TC）的含量[9]。

1.4　仔猪粪便中微生物数量测定

按照 QIA amp DNA stool mini kit (QIAgen 公司，德国)的方法提取粪便中微生物 DNA，参照焦金真等[10]的方法进行微生物定量 PCR 分析，并计算粪便中微生物的数量，结果以每克粪便中含有的微生物拷贝数的对数值[lg(copies/g)]表示。微生物绝对定量 PCR 的特异性引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，微生物的特异性引物序列见表 1。

表 1　微生物的特异性引物序列

Table 1　Specific primer sequences for microbes

项目 Items	引物序列 primer sequences (5'−3')	产物大小 Product size/bp
双歧杆菌	F: TCGCGTCYGGTGTGAAAG	128
Bifidobacterium	R: GGTGTTCTTCCCGATATCTACA	
乳酸杆菌	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA	345
Lactobacillus	R: ATTCCACCGCTACACATG	
大肠杆菌	F: CATGCCGCGTGTATGAAGAA	95
Escherichia coli	R: CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	
厚壁菌门	F: GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA	126
Firmicutes	R: AGCTGACGACAACCATGCAC	

F：上游引物 forward primer；R：下游引物 reverse primer。

1.5　仔猪粪便中微生物代谢产物含量测定

采用气相色谱法测定粪便中乙酸、丙酸和丁酸的含量，采用液相色谱法检测粪便中色胺、酪胺、精胺和亚精胺的含量[11]。

1.6　数据统计与分析

试验数据用 Excel 2010 进行初步整理后，利用 SPSS 18.0 软件进行独立样本 *t* 检验，数据均以“平均值±标准误”表示。P<0.05 表示差异显著，0.05≤P<0.10 表示有变化趋势。

2　结　果

2.1　母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌对哺乳仔猪血浆生化参数的影响

由表 2 可知，与对照组相比，试验组 21 日龄仔猪血浆 UN 和 TG 含量显著降低（P<0.05）；其他各指标差异不显著（P＞0.05）。

表 2　母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌对哺乳仔猪血浆生化参数的影响

Table 2　Effects of *Bacillus subtilis* supplementation in diets of sows on plasma biochemical parameters of suckling piglets (n=8)

项目 Items	日龄 Days of age	对照组 Control group	试验组 Experiment group
总蛋白	7	58.26±0.77	57.13±1.05
TP/(g/L)	21	56.66±1.18	53.02±2.33
白蛋白	7	18.13±1.11	19.56±0.33

ALB/(g/L)	21	41.09±0.57	40.90±1.16
尿素氮	7	1.51±0.22	1.78±0.17
UN/(mmol/L)	21	4.69±0.71	2.73±0.42*
甘油三酯	7	0.74±0.09	0.71±0.05
TG/(mmol/L)	21	1.24±0.23	0.53±0.06*
总胆固醇	7	4.00±0.19	3.80±0.15
TC/(mmol/L)	21	4.98±0.36	4.34±0.34

*表示与对照组比较差异显著（P<0.05）。下表同。

* means significant difference compared with the control group (P<0.05). The same as below.

2.2 母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌对哺乳仔猪粪便微生物数量的影响

由表 3 可知，与对照组相比，试验组 7 日龄仔猪粪便中大肠杆菌数量显著降低（P＜0.05），乳酸杆菌/大肠杆菌呈增加趋势（P=0.053）；其他各指标差异不显著（P＞0.05）。

表 3 母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌对仔猪粪便微生物数量的影响

Table 3 Effects of *Bacillus subtilis* supplementation in diets of sows on fecal microbe amount of suckling piglets lg(copies/g)

项目 Items	日龄 Days of age	对照组 Control group	试验组 Experiment group
双岐杆菌	7	5.63±0.64	5.81±0.43
Bifidobacterium	21	4.33±0.34	5.16±0.45
乳酸杆菌	7	8.48±0.55	9.12±0.45
Lactobacillus	21	8.07±0.42	8.32±0.45
大肠杆菌	7	9.10±0.17	8.40±0.25*
Escherichia coli	21	8.15±0.25	8.53±0.12
乳酸杆菌/大肠杆菌	7	0.93±0.05	1.09±0.06
Lactobacillus/ Escherichia coli	21	0.99±0.05	0.98±0.05
厚壁菌门	7	10.50±0.11	9.51±0.55
Firmicutes	21	9.90±0.20	9.28±0.40

2.3 母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌对仔猪粪便微生物代谢产物含量的影响

由表 4 可知，与对照组相比，试验组 7 日龄仔猪粪便中乙酸和色胺含量显著增加（P＜0.05），亚精胺（P=0.068）和精胺（P=0.074）含量呈增加趋势；21 日龄仔猪粪便中亚精胺和精胺含量显著降低（P＜0.05）；其他各指标差异不显著（P＞0.05）。

表 4 母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌对仔猪粪便微生物代谢产物含量的影响

Table 4 Effects of *Bacillus subtilis* supplementation in diets of sows on fecal microbial metabolite contents of suckling piglets

项目	日龄	对照组	试验组

Items	Days of age	Control group	Experiment group
乙酸	7	2.61±0.22	3.65±0.41*
Acetate/(mg/g)	21	2.06±0.24	2.06±0.21
丙酸	7	0.57±0.11	0.81±0.15
Propionate/(mg/g)	21	0.91±0.18	0.92±0.13
丁酸	7	0.62±0.17	0.51±0.16
Butyrate/(mg/g)	21	0.43±0.10	0.70±0.13
色胺	7	1.68±0.65	5.75±1.61*
Tryptamine/(μg/g)	21	1.57±0.44	1.98±0.25
酪胺	7	2.56±1.33	7.38±2.25
Tyramine/(μg/g)	21	1.00±0.28	3.41±2.87
亚精胺	7	28.01±3.95	38.75±3.67
Spermidine/(μg/g)	21	27.94±3.73	15.53±2.40*
精胺	7	2.64±0.22	4.71±0.98
Spermine/(μg/g)	21	2.25±0.29	1.28±0.17*

3 讨 论

动物血浆生化参数可反映动物体内营养物质代谢情况。其中，血浆 UN 含量可评价动物机体蛋白质代谢和饲粮氨基酸的平衡状况，当氨基酸平衡状况良好时血浆 UN 含量下降，机体蛋白质合成增强或分解能力降低[12]；血浆 TG 含量可直接反映动物机体的脂代谢状况，决定脂肪组织发育和脂肪沉积能力，其含量越低脂肪利用率就越高[9]。本试验中，母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌可显著降低 21 日龄仔猪血浆中 UN 和 TG 含量，提示哺乳仔猪对脂肪和蛋白质的利用增强。这与前期研究中仔猪生长性能的变化基本一致，即母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌提高了仔猪的初生窝重、初生个体均重、断奶窝重、断奶窝个体均重和平均日增重等[7]。但也有研究表明，在断奶仔猪饲粮中添加芽孢杆菌制剂对血清 UN 和 TG 含量无显著影响[13]，这可能与菌种的种类、活性、添加方式或剂量不同有关。

在正常情况下，动物肠道微生物菌群和数量维持在相对稳定的状态。当机体遭遇应激时，肠道菌群失衡，进而引发肠道炎症和腹泻等，严重影响动物的生长发育[14]。在动物肠道菌群中，大肠杆菌是引起仔猪腹泻的主要有害菌。本试验中，母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌可降低 7 日龄仔猪粪便中大肠杆菌数量，提高乳酸杆菌/大肠杆菌，提示仔猪肠道菌群平衡得到改善，进而降低了哺乳仔猪的腹泻率[7]。这可能是由于母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌增加了母猪肠道和粪便中有益菌的数量[6]，从而促进了乳酸菌、芽孢杆菌等有益菌在仔猪肠道中的早期定植，减少了仔猪接触大肠杆菌等病原菌的几率[15-16]。Lee 等[14]研究表明，断奶仔猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌显著降低了肠道大肠杆菌数量，改善了肠道形态结构，促进了营养物质的吸收利用。

肠道中乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸主要由厌氧微生物发酵不易消化的碳水化合物和蛋白质产生，可被结肠吸收，为机体提供能量，具有抵抗病原菌、调节肠道菌群平衡和维持肠道健康等作用[17-18]。本试验中，母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌可显著增加 7 日龄哺乳仔猪粪便中乙酸含量，这可降低结肠 pH，抑制大肠杆菌等病原菌繁殖，还可通过激活副交感神经系统促进胰岛素和生长激素释放肽的分泌，增强食欲[19]，进而有利于仔猪肠道健康和生长，这可能与肠道内有益菌比例增加有关。辛娜等[20]也曾报道，给仔猪饲喂芽孢杆菌可增加肠道中短链脂肪酸含量，降低肠道 pH，优化肠道环境。结肠微生物发酵含氮物质可产生色胺、精胺和亚精胺等生物胺[21]。其中，色胺是调节胃肠道蠕动、分泌、免疫功能和抗氧化应激的重要介质[22]；精胺或亚精胺可调节核酸和蛋白质等大分子物质合成，促进肠道形态结构和吸收功能的成熟[11]。本试验中，母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌可显著增加 7 日龄哺乳仔猪粪便中色胺含量，这可促进仔猪肠道的生长发育和消化吸收功能，并在一定程度上增强机体的免疫力。上述效果可能与肠道微生物促进了色氨酸的分解代谢有关。本试验中，母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌后，7 日龄哺乳仔猪粪便中精胺和亚精胺含量呈增加趋势，21 日龄哺乳仔猪粪便中精胺和亚精胺含量显著降低。这可能与初乳中精胺、亚精胺等生物胺含量较高有关[21]。笔者前期研究发现，饲粮中添加枯草芽孢杆菌可显著增加妊娠母猪粪便中精胺和亚精胺含量[6]。由于 21 日龄仔猪生长发育较快，营养需求量大，精胺和亚精胺被肠上皮细胞吸收较多，进而引起仔猪肠道生物胺含量降低。陶青燕等[23]给哺乳小鼠灌服精胺或亚精胺，可促进其肠道成熟，降低早期断奶应激，增强肠道黏液屏障。

4 结 论

母猪饲粮中添加枯草芽孢杆菌可调控脂代谢和氮代谢相关血浆生化参数，减少肠道中大肠杆菌数量，增加肠道部分生物胺和乙酸含量，从而改善哺乳仔猪的肠道健康和生长发育。

参考文献：

[1] 李春丽,崔淑贞,惠参军,等.微生态制剂对哺乳仔猪生长及免疫机能的影响[J].中国畜牧兽医,2005,32(5):7-10.

[2] 侯冠彧,周汉林,施力光,等.几种常用饲料添加剂对断奶仔猪肠道菌群调控的研究进展[J].中国畜牧兽医,2016,43(11):2939-2944.

[3] 苏国旗,王军,曹猛,等.母猪妊娠期营养水平对后代仔猪肌肉生长和发育的影响[J].动物营养学报,2016,28(4):1050-1059.

[4] 刘晴,黄华,唐景春,等.复合益生菌菌剂对母猪生产性能和肠道菌群生态的影响[J].家畜生态学报,2016,37(2):72-76.

[5] 张爱武,薛军.枯草芽孢杆菌在动物生产中的应用效果[J].中国畜牧兽医,2011,38(4):234-238.

[6] 韩丽,解培峰,孔祥峰,等.枯草芽孢杆菌对围产期母猪粪便微生物及其代谢产物的影响[J].动物营养学报，2018，30（3）：201709045 待补充.

[7] 韩丽,孔祥峰,赵越,等.枯草芽孢杆菌对围产期母猪繁殖性能和子代生长的影响[J].动物营养学报,2017,29(12):4440-4446.

[8] 黄雪泉.添加枯草芽孢杆菌制剂对仔猪生产性能的影响[J].中国畜牧兽医,2010,37(7):212-214.

[9] 祝倩,孔祥峰,姬玉娇,等.高、低营养水平饲粮对妊娠环江香猪繁殖性能、体成分和血浆生化参数的影响[J].动物营养学报,2016,28(5):1534-1540.

[10] 焦金真,王芃芃,汤少勋,等.浏阳黑山羊胃肠道不同部位重要功能微生物的数量分布特征研究[J].畜牧兽医学报,2013,44(10):1590-1599.

[11] 李华伟,苏家宜,孔祥峰,等.饲粮添加发酵中药渣对围产期母猪粪便微生物及其代谢产物的影响[J].动物营养学报,2017,29(9):3232-3239.

[12] 杨海英,杨在宾,杨维仁,等.益生素和低聚木糖对断奶仔猪生产性能、消化酶活性、血液指标和肠道微生物的影响[J].中国兽医学报,2009,29(7):914-919.

[13] 孙梅,张一平,张宪中,等.芽孢杆菌制剂对断奶仔猪血液和免疫指标的影响[J].中国畜牧兽医,2015,42(11):2991-2998.

[14] LEE S H,INGALE S L,KIM J S,et al.Effects of dietary supplementation with *Bacillussubtilis* LS 1–2 fermentation biomass on growth performance, nutrient digestibility,cecal microbiota and intestinal morphology of weanling pig[J].Animal Feed Science and Tschnology,2014,188:102-110.

[15] LE H D,HUYNH A H,NGUYEN Q U,et al.Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores[J].Vaccine,2004,22(15/16):1873-1885

[16] 贺国龙,张恒,董爱华,等.饲喂枯草芽孢对草鱼粪便、养殖水体中芽孢数量和水质的影响[J].淡水渔业,2012,42(2):35-39.

[17] KONG X F,JI Y J,LI H W,et al.Colonic luminal microbiota and bacterial metabolite composition in pregnant *Huanjiang* mini-pigs:effects of food composition at different times of pregnancy[J].Scientific Reports,2016（6）:37224.

[18] KONG X F,ZHOU X L,LIAN G Q,et al.Dietary supplementation with

chitooligosaccharides alters gut microbiota and modifies intestinal luminal metabolites in weaned Huanjiang mini-piglets[J].Livestock Science,2014,160:97-101.

[19] PERRY R J,PENG L,BARRY N A,et al.Acetate mediates a microbiome-brain-β-cell axis to promote metabolic syndrome[J].Nature,2016,534(7606):213-217.

[20] 辛娜,张乃锋,刁其玉,等.芽孢杆菌制剂对断奶仔猪生长性能、胃肠道发育的影响[J].畜牧兽医学报,2012,43(6):901-908.

[21] 王小城,熊霞,印遇龙,等.外源多胺对断奶仔猪肠道结构和功能的作用及机制[J].动物营养学报,2014,26(9):2457-2462.

[22] BLACHIER F,MARIOTTI F,HUNEAU J F,et al.Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences[J].Amino Acids,2007,33(4):547-562.

[23] 陶青燕,王康宁.哺乳期灌服亚精胺或精胺对早期断奶大鼠生长及肠道发育的影响[J].中国畜牧杂志,2009,45(9):24-27.

Effects of *Bacillus subtilis* Supplementation in Diets of Sows on Plasma Biochemical Parameters, Feces Microbes and Their Metabolites of Suckling Piglets[i]

HAN Li[1,2] XIE Peifeng[1] ZHAO Yue[1,2] GAO Qiankun[2] ZHANG Wenming[3] WANG Zhanbin[2] YIN Yulong[1] KONG Xiangfeng[*]

(1. *Key Laboratory of Agro-Ecological Processes in Subtropical Region, Laboratory of Animal Nutritional Physiology and Metabolic Process, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha* 410125, *China;* 2. *College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang* 471003, *China;* 3. *Evonik Degussa (China) Co., Ltd., Beijing* 100600, *China)*

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of *Bacillus subtilis* supplementation in diets of sows on plasma biochemical parameters, fecal microbes and their metabolites of suckling piglets. Forty healthy Large White sows at close to 85 days of gestation during 2 to 4 parities were used and randomly allocated to two groups with 20 pigs per group. Sows in the control group were fed a basal diet, and others in the experiment group were fed the basal diet supplemented with 250 g/t *Bacillus subtilis* preparation. The diets were fed from 85 days post service to postpartum 21 days. At 7 and 21 days of age, eight litters per group were randomly

chose and one piglet with similar body weight per litter was collected the blood samples by precaval vein, and then the plasma were obtained for analyzing biochemical parameters; the samples of fresh feces were collected to analyze the amount of microbes and contents of short chain fatty acid (SCFA) and bioamines. The results showed that compared with the control group, the fecal acetate and tryptamine contents of piglets at 7 days of age in experiment group were significant increased (P<0.05), the fecal *Escherichia coli* amount was significant decreased (P<0.05), and the ratio of *Lactobacillus* to *Escherichia coli* (P=0.053) and the fecal spermidine (P=0.068) and spermine (P=0.074) contents were showed an increasing trend; the plasma urea nitrogen and triglycerides contents of piglets at 21 days of age in experiment group were significant decreased (P<0.05), as well as the fecal spermidine and spermine contents (P<0.05). Collectively, *Bacillus subtilis* supplementation in diets of sows can regulate plasma biochemical parameters related to fat and nitrogen metabolism, decrease the intestinal *Escherichia coli* amount, and increase the contents of several bioamines and acetic acid, also improve intestinal health and growing development of suckling piglets.

Key words: pregnant sows; suckling piglets; *Bacillus subtilis*; biochemical parameters; microbes; metabolites

*Corresponding author, professor, E-mail: nnkxf@isa.ac.cn

（责任编辑　武海龙）